

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 11 APR 2000

WIPO PCT

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

000/330

Bescheinigung

Herr Professor Dr. Götz N o w a k in Jena/Deutschland hat eine Patentanmeldung
unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Thrombininhibitoren"

am 4. Februar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

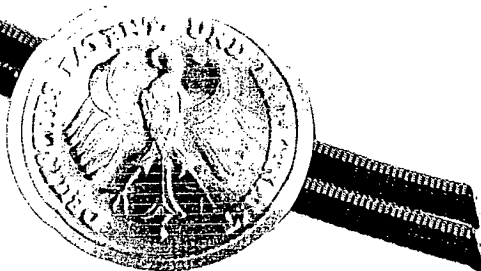
Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
C 12 Q 1/56 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 15. März 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag



Aktenzeichen: 199 04 674.3

Nietiedt



20

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung
 5 der Konzentration von Thrombininhibitoren in einer
 nicht-trüben Körperflüssigkeit oder einem nicht-trüben
 Extrakt aus einer Körperflüssigkeit. Sie weist die
 folgenden Verfahrensschritte auf. Einem Lebewesen wird
 die Körperflüssigkeit entnommen und die Körperflüssig-
 10 keit wird erforderlichenfalls einer Abtrennung von
 Trübstoffen unterworfen. Der so erhaltenen nicht-
 trüben Körperflüssigkeit werden ein nicht in die Um-
 wandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw.
 Mtdesfgl eingreifendes gerinnungshemmendes Mittel, ein
 15 durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbares
 chromogenes oder flourogenes Substrat und eine
 Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltende
 Substanz zugegeben, sowie, optional, Prothrombin. Die
 so erhaltene Lösung bzw. Mischung wird einer wellen-
 20 längenselektiven Lichtabsorptions- oder Lichtemis-
 sionsmessung in Abhängigkeit von der Zeit unterworfen.
 Aus der Abnahme der Lichtabsorption oder Lichtemission
 je Zeiteinheit wird die in der Körperflüssigkeit en-
 thaltene Menge des Thrombininhibitors durch Vergleich
 25 mit ermittelten Standardkurven bestimmt.

30

1

Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Thrombininhibitoren

5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung
der Konzentration von Thrombininhibitoren, wobei einem
Lebewesen Körperflüssigkeit entnommen wird und wobei
10 der Körperflüssigkeit eine Prothrombin in Meizothrom-
bin bzw. Meizothrombin-des Fragment 1 (folgend
MTdesfg1) spaltende Substanz zugegeben wird. - Als
Thrombininhibitoren werden alle natürlichen oder syn-
thetische Stoffe verstanden, die Thrombin oder Throm-
15 binvorläufer direkt inhibieren. Als Beispiel für einen
natürlichen Thrombininhibitor ist Hirudin zu nennen,
welches aus dem Speichel von *Hirudo medicinalis* gewon-
nen werden kann. Hirudin ist ein sehr kleines Protein
bestehend aus 65 Aminosäuren und mit einem Molekular-
20 gewicht von 7 kD. Beispiele für synthetische Thrombin-
inhibitoren sind die sogenannten Hirologe, welche dem
Hirudin analoge bzw. homologe Teilsequenzen aufweisen,
sowie Polypeptide bestehend aus oder mit einem Tripep-
tid Phe-Pro-Arg oder Derivaten eines solchen Tripep-
25 tids, wie beispielsweise Borsäurederivate,
Chloromethylketonderivate, Benzamidinderivate, Argini-
nale, aminosäuremodifizierte Derivate und dergleichen.
Den vorstehenden Substanzen ist höchstwahrscheinlich
der im wesentlichen gleiche Wirkmechanismus wie bei
30 Hirudin gemeinsam. Als Spenderlebewesen für die Kör-
perflüssigkeit kommen Menschen und Säugetiere, wie
beispielsweise Rodenten, in Frage. Beispiele für Kör-
perflüssigkeiten sind insbesondere Blut bzw. aus Blut

hergestelltes Blutplasma. Aber auch Körperflüssigkeiten, welche kein Prothrombin enthalten, kommen in Frage, wie z.B. Urin, Liquor, Speichel, Peritonealflüssigkeit u.a. Dann wird im Rahmen der Erfindung Prothrombin zugesetzt. Nicht-trüb meint, daß keine beachtlichen Mengen an Schwebstoffen in der zu untersuchenden Körperflüssigkeit vorliegen sollen. Dies kann erforderlichenfalls beispielsweise durch Zentrifugation der Körperflüssigkeit und Abzug des Überstandes erreicht werden.

Der der Erfindung zugrundeliegende theoretische Hintergrund ist der folgende: Die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin ist ein wesentlicher Faktor in der Blutgerinnung. Thrombin wirkt auf die Bildung von Fibrinmonomeren aus Fibrinogen sowie auf die Polymerisation der Fibrinmonomere. Prothrombin wird in Thrombin umgewandelt unter Mitwirkung von aktiviertem Faktor X, aktiviertem Faktor V Ca^{++} -Ionen und Phospholipiden, wie z.B. Plättchenfaktor 3. Hierbei findet eine mehrstufige Reaktion statt, wobei Intermediate in vergleichbar geringer Menge gebildet werden. Wenn jedoch die Koagulation mittels beispielsweise Ecarin oder einem anderen Schlangengift bzw. Schlagengiftfraktion eingeleitet wird, so entsteht demgegenüber ein "atypisches" Intermediat, beispielsweise Meizothrombin, PIVKA Meizothrombin oder Meizothrombin-Fragment-1 (PIVKA ist eine Abkürzung für ein Protein, welches durch einen Vitamin K Antagonisten induziert wird). Diese atypischen Intermediate werden interessanterweise durch beispielsweise Hirudin inaktiviert, nicht jedoch durch Heparin (Inhibitor der Faktoren IIa, IXa, XIa, XIIa und/oder Antithrombin). Sie führen

im übrigen ebenfalls zur Thrombinbildung und subsequent zur Gerinnung. Die Affinität von Hirudin und anderen synthetischen Thrombininhibitoren zu den atypischen Intermediaten ist sehr hoch ($k_1 > 10^{-10}$ mol/l für Meizothrombin), so daß freies atypisches Intermediat von dem Thrombininhibitor kurzfristig gebunden wird.

Die vorstehenden Zusammenhänge werden in einem Verfahren der eingangs genannten Art, welches beschrieben ist in der Literaturstelle US-A-5,547,850, genutzt, wobei gleichsam der Verbrauch des Thrombininhibitors durch Messung der Verzögerung der Gerinnung erfaßt wird. Eine große Menge an Thrombininhibitor führt zu einer langen Zeit bis zum Gerinnungseintritt und umgekehrt. Dieses Verfahren hat sich in der Praxis grundsätzlich ausgezeichnet bewährt. Als nachteilig hat sich jedoch erwiesen, daß in Fällen verminderten Fibrinogenspiegels Verfälschungen auftreten können, da ein (zu) geringer Fibrinogenspiegel ebenso wie ein hoher Thrombininhibitorspiegel zu langen Gerinnungszeiten führen kann.

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, ein Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Thrombininhibitoren anzugeben, welches unabhängig vom Fibrinogenspiegel genaue Werte liefert.

Zur Lösung dieses Problems lehrt die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben Körperflüssigkeit oder einem nicht-trüben Extrakt aus einer Körperflüssigkeit mit den folgenden Verfahrensschritten: a)

- einem Lebewesen wird die Körperflüssigkeit entnommen und die Körperflüssigkeit wird erforderlichenfalls einer Abtrennung von Trübstoffen unterworfen, b) der in Stufe a) erhaltenen nicht-trüben Körperflüssigkeit
- 5 werden ein nicht in die Umwandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl eingreifendes gerinnungshemmendes Mittel, ein durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbares chromogenes oder flourogenes Substrat und eine Prothrombin in Meizothrombin bzw.
- 10 Mtdesfgl-spaltende Substanz zugegeben, sowie, optional, Prothrombin, c) die in Stufe b) erhaltene Lösung bzw. Mischung wird einer wellenlängenselektiven Lichtabsorptions- oder Lichtemissionsmessung in Abhängigkeit von der Zeit unterworfen, d) aus der Ver-
- 15 minderung der Lichtabsorption oder Lichtemission in Stufe c) je Zeiteinheit wird die in der Körperflüssigkeit enthaltene Menge des Thrombininhibitors durch Vergleich mit ermittelten Standardkurven bestimmt. Alternativ zur Prothrombin in Meizothrombin bzw.
- 20 Mtdesfgl spaltenden Substanz oder ergänzend kann Meizothrombin bzw. Mtdesfgl zugegeben sein. Weiterhin lehrt die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung der (spezifischen) Aktivität von Thrombininhibitoren (zur Hemmung von generiertem Meizothrombin bzw. MTdesFgl)
- 25 in einer nicht-trüben wässrigen Flüssigkeit mit den folgenden Verfahrensschritten: a) einem Lebewesen wird eine Körperflüssigkeit entnommen und die Körperflüssigkeit wird erforderlichenfalls einer Abtrennung von Trübstoffen unterworfen oder eine nicht-trübe Flüssig-
- 30 keit wird künstlich hergestellt, b) der in Stufe a) erhaltenen nicht-trüben Flüssigkeit werden eine vorgegebene Menge an Thrombininhibitor, ggf. ein nicht in die Umwandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw.

Mtdefgl eingreifendes gerinnungshemmendes Mittel, ein durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdefgl spaltbares chromogenes oder flourogenes Substrat und eine Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdefgl spaltende Substanz oder Meizothrombin bzw. Mtdefgl zugegeben, sowie, optional, Prothrombin, c) die in Stufe b) erhaltene Lösung bzw. Mischung wird einer wellenlängenselektiven Lichtabsorptions- oder Lichtemissionsmessung in Abhängigkeit von der Zeit unterworfen, d) aus der Verminderung der Lichtabsorption oder Lichtemission in Stufe c) je Zeiteinheit wird die Aktivität des Thrombininhibitors durch Vergleich (des Betrages der negativen Steigung) mit ermittelten Standardkurven bestimmt. - Als chromogenes Substrat werden Substanzen bezeichnet, welche chromophore Gruppen enthalten und spezifisch von Thrombin farbgebend gespalten werden. Flourogene Substrate sind Substanzen, welche spezifisch von Thrombin unter Bildung von floureszierenden Substanzen spaltbar sind. Prothrombin kann zugesetzt werden, wenn die Körperflüssigkeit nicht natürlicherweise ausreichend Prothrombin enthält, wie beispielsweise im Falle von Vitamin K Mangel, oder wenn die zu erwartende Menge an Thrombininhibitor oder Aktivität des Thrombininhibitors dies empfiehlt, oder wenn während einer Krankheit ein Prothrombin-Mangel aufgetreten ist.

Die Erfindung beruht auf der überraschenden Erkenntnis, daß chromogene bzw. flourogene Substanzen, welche spezifisch von Thrombin gespalten werden, ebenso spezifisch von Meizothrombin bzw. Mtdefgl spaltbar sind. Dies ist nicht zu erwarten, da Intermediate zwar notwendige Vorstufen darstellen, jedoch

natürlicherweise nicht dieselbe Wirkungen bzw. Reaktivitäten wie das Thrombin entfalten. Dadurch, daß die erfindungsgemäße Nachweisreaktion allein durch die Überwachung der Meizothrombin bzw. Mtdesfgl-Inhibierung mittels einer Farbreaktion erfolgt, ist der Nachweis völlig unabhängig von dem Fibrinogenspiegel. Vielmehr muß beim Einsatz von Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut bzw. Blutplasma, die Gerinnung sogar unterbunden werden, um die Farbreaktionsauswertung nicht zu stören. Zudem ist die erfindungsgemäße Thrombininhibitorbestimmung in allen Bereichen mindestens ebenso genau, wie die Bestimmung mittels der vorbekannten Methode bei hohem Fibrinogenspiegel. Auch besteht Unabhängigkeit von eventuell in der Körperflüssigkeit enthaltenen, oral verabreichten Antikoagulantien. Weitere Vorteile sind: schnelle Messung innerhalb von Minuten in chromogenen Kanälen üblicher Gerinnungsautomaten (diese messen eine Trübung oft bei mehreren Wellenlängen zwecks Korrektur und weisen daher in der Regel die Möglichkeit zur wellenlängenselektiven und wellenlängenvariablen Lichtabsorptionsmessung auf); hohe Reproduzierbarkeit der gefundenen Werte aufgrund einer sehr niedrigen Streuung der Einzelwerte (das Konfidenzintervall liegt gemäß einer Vielzahl von Versuchsserien unter 5%, in der Regel bei 2,2 - 3,5%); die hohe Genauigkeit bzw. Reproduzierbarkeit wird zudem auch bei sehr hohen Thrombininhibitor- bzw. Hirudinspiegeln erreicht; aufgrund der vorstehenden Eigenschaften eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren zur nationalen und internationalen Standardisierung.

Das erfindungsgemäße Verfahren findet Einsatz einer-
 seits in der Wissenschaft, nämlich in allen Bereichen
 von Untersuchungen, in denen Thrombininhibitorkonzen-
 trationen bestimmt werden müssen, sowie dem (ggf. high
 5 capacity) Screenen von prospektiven Thrombininhibi-
 toren. In letzterem Fall kann mit hohem Durchsatz eine
 Vielzahl von synthetischen prospektiven Inhibitoren
 auf ihre tatsächliche Wirkung untersucht werden. Ak-
 tivität meint hierbei die Feststellung, ob überhaupt
 10 eine Inhibierung stattfindet und bejahendenfalls, wie
 die Kinetik bzw. spezifische Aktivität ist. Anderer-
 seits bietet sich auch der klinische Einsatz an,
 beispielsweise bei der Überwachung von Thrombininhibi-
 torspiegeln bei Patienten, welchen der Inhibitor aus
 15 therapeutischen Gründen verabreicht wird. Auf einfache
 und kostengünstige Weise kann so vermieden werden, daß
 eine Unter- oder Überdosierung des Thrombininhibitors
 stattfindet, und zwar sowohl in quasi-kontinuierlicher
 oder diskontinuierlicher Überwachung.

20 Im einzelnen kann das nicht in die Umwandlung
 Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mdesfgl ein-
 greifende gerinnungshemmende Mittel ausgewählt sein
 aus der Gruppe "Calcium-Komplexbildner, Heparin,
 25 Heparinoide, Antithrombin III, Protein C, Fibrinpolym-
 erisationshemmstoffe und Mischungen aus diesen Stof-
 fen". Ein konkretes Beispiel hierfür ist Pefabloc FG
 der Firma Pentapharm AG, Basel, Schweiz, welches ein
 Tetrapeptid (Gly-Pro-Arg-Pro) ist und mit hoher Af-
 30 finität die Fibrinogen-Polymerisation verhindert. Die
 Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mdesfgl spaltende
 Substanz kann ausgewählt sein aus der Gruppe der
 Schlangengifte und Schlangengiftfraktionen,

beispielsweise Gifte von Dispholidus, Rhabdophis, Bothrops, Notechis, Oxyuranus und Russel Viperen. Zweckmäßigerweise werden gereinigte Fraktionen daraus verwendet. Vorzugsweise wird Ecarin, eine hochgradig gereinigte Fraktion des Echis-carinatus Toxins oder Multisquamase, das Prothrombin-spaltende Enzym aus Echis multisquamatus, verwendet. Solche Substanzen, wie beispielsweise Ecarin sind käuflich erwerbbar u.a. von der Firma Pentapharm AG, Schweiz.

10

Das durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbare chromogene Substrat kann unter Spaltung p-Nitroanilin freisetzen und die Lichtabsorptionsmessung kann dann bei 405 nm durchgeführt werden. Beispiele für solche oder auch andere Substrate sind Tripeptide, welche unter den Namen Chromozym TH oder Pefachrom TH von den Firmen Chromogenix, Boehringer, Pentapharm erhältlich sind (Pefachrome TH ist H-D-ChG-Ala-Arg-pN.2AcOH). Ein Beispiel für flouochrome Substrate ist Pefachrom TH flourogen, welches unter den Namen Pefa 15865 von der Firma Pentapharm erhältlich sind.

Im einzelnen empfiehlt es sich bei den in Frage kommenden Aktivitäten, in Stufe c) eine erste Absorptions- oder Emissionsmessung nach 0 - 100 s, vorzugsweise 0 - 50, höchstvorzugsweise 5 - 15 s, und eine zweite nach anschließenden 10 - 1000 s, vorzugsweise 50 - 500 s, höchstvorzugsweise 150 - 300 s, gezählt ab Zugabe der Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltenden Substanz oder des Meizothrombins bzw. MTdesfgl, durchzuführen. Das erfindungsgemäße Verfahren ist insbesondere zur Bestimmung vom Hirudin oder der Bestimmung der Konzentration und/oder

der Aktivität von synthetischen Thrombininhibitoren oder Hirulogen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Test Kit zur Bestimmung der Konzentration von Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben Körperflüssigkeit oder einem nicht-trüben Extrakt aus einer Körperflüssigkeit mit folgenden Kitkomponenten: K1) einer Lösung eines nicht in die Umwandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl eingreifenden gerinnungshemmenden Mittel, K2) einem durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbaren chromogenen oder flourogenen Substrat und K3) einer Lösung einer Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltenden Substanz, wobei die Komponente K3) ersetzt oder ergänzt sein kann durch eine Komponente K3a) einer Lösung mit Meizothrombin bzw. Mtdesfgl, sowie ein Test Kit zur Bestimmung der Aktivität von Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben Körperflüssigkeit oder einem nicht-trüben Extrakt aus einer Körperflüssigkeit oder einer nicht-trüben natürlichen wäßrigen Flüssigkeit mit folgenden Kitkomponenten: optional K1) einer Lösung eines nicht in die Umwandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl eingreifenden gerinnungshemmenden Mittel, K2) einem durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbaren chromogenen oder flourogenen Substrat und K3) einer Lösung einer Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltenden Substanz, wobei die Komponente K3) ersetzt oder ergänzt sein kann durch eine Komponente K3a) einer Lösung mit Meizothrombin bzw. Mtdesfgl. Die Kitkomponenten können voneinander getrennt aber in einer einzigen Testkitpackung vorgesehen sein. Es kann

als optional einsetzbare zusätzliche Kitkomponente eine Lösung mit Prothrombin vorgesehen ist.

- Aufgrund des für Screeningzwecke besonders geeigneten 5 erfindungsgemäßen Verfahrens sind auch Gegenstand der Erfindung damit gefundene bzw. charakterisierten neue Thrombininhibitoren, welche nämlich erhältlich sind durch folgende Verfahrensschritte: A) Elemente einer Gruppe von prospektiven Thrombininhibitoren werden in 10 vorgebener und vorzugsweise gleicher Konzentration subsequent oder getrennt simultan einem Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 8 unterworfen, B) Die Verminderung der Lichtabsorption oder Lichtemission je Zeiteinheit wird für jeden prospektiven Thrombinin- 15 hibitor ermittelt und mit der unter gleichen Bedingungen bestimmten Lichtabsorption oder Lichtemission je Zeiteinheit einer vorgegebenen, vorzugsweise gleichen Konzentration von Hirudin verglichen, C) es werden diejenigen prospektiven Thrombininhibitoren aus- 20 gewählt, deren Verminderung der Lichtabsorption oder Emission je Zeiteinheit mindestens 10% der entsprechenden Abnahme bei Einsatz von Hirudin entspricht.
- 25 Für das erfindungsgemäße Test Kit sowie die erfindungsgemäß aufgefundenen Thrombininhibitoren gelten die zum erfindungsgemäßen Verfahren getroffenen Detaillierungen entsprechend.
- 30 Sofern Meizothrombin bzw. Mdesfgl eingesetzt wird, so kann dies käuflich erworben werden, beispielsweise von der Fa. Pentapharm AG, Schweiz, aber auch beispielsweise gemäß der Vorschrift in der Literaturstelle

US-A-5,547,850 hergestellt werden an immobilisiertem Ecarin.

Bei den im Rahmen der Erfindung einsetzbaren Geräten 5 handelt es beispielsweise um meist ohnehin vorhandene halb- oder vollautomatische Gerinnungsgeräte. In Frage kommen dabei z.B. Gerinnungsautomaten des Typs Sysmex CA-500 oder S2000 der Firma Dade-Behring oder des Typs Electra 2000. Beim CA-500 wird das von einer LED emit- 10 tierte Licht durch einen Filter (405nm) gesandt und anschließend durch die Probe. Das CA-500 bestimmt im chromogenen Kanal die Änderung bzw. Verminderung der Lichtabsorption von Farbstoffen, wie z.B. pNA (p-Nitroanilin). Ist in einer Probe beispielsweise Hi- 15 rudin, so wird das generierte oder zugegebene Mel-zothrombin bzw. Mdesfgl inaktiviert mit der Folge einer dadurch behinderten pNA-Freisetzung. Die in- sofern sich anders verhaltende (ändernde) optische Dichte der Probe wird mittels einer Photodiode auf- 20 genommen und ausgewertet. Die zu beobachtende Lichtab- sorptionsänderung ist umgekehrt proportional der Hirudinaktivität.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich 25 Ausführungsbeispiele darstellenden Experimenten näher erläutert.

Zur Bestimmung einer Standardkurve wurde gepooltes Humancitratplasma mit vorgegebenen Mengen Hirudin- 30 lösung versetzt. Die so erhaltenen Standardlösungen wurden in einem CA-500 gemessen.

Als Reagenzien wurden eingefüllt,

12

Reagent 1 [Inhib] (Raumtemperatur): 400µl Pefabloc FG.
(20 mM; gelöst in 0,9% NaCl) + 2100 µl Tris-Puffer,

5 Reagent 2 [Chromol] (Raumtemperatur): Pefachrome TH
(10µmol/vial), verdünnt auf 3µmol/ml Aq. dest,

Reagent 3 [Ecarin] (15°C): Ecarin (50 EU/vial),
verdünnt auf 0,3 EU/ml (der Inhalt des Ecarinfläsch-
10 chen wird in 5ml 0,9% NaCl-Lösung gelöst und kurz vor
dem Einsatz mit einer 1:2-Mischung aus 0,9% NaCl, en-
thaltend 1% Prionex (Merck), und 0,1M CaCl₂-Lösung auf
die Endkonzentration eingestellt.

15 Das Testprotokoll ist folgend wiedergegeben. Als Dil.
Buffer wurde eingesetzt eine Mischung aus 16,6µl
Prothrombin (gereinigt; Proteingehalt: 2,22 mg/ml) und
984 µl einer Mischung aus 900µl Tris-Puffer (0,05 M,
pH 8, 37°C, + 0,1M NaCl) und 100µl Prionex (Merck).

20

25

30

13

Testprotokoll: Name Ecch

Detector	Chrom
Start Point	5 sec
End Point	180 sec
Sensitivity	Low Gain
1 SampleVol.	Zitratplasma 5 µl
Dil. Vol.	Buffer 70 µl
2 SampleVol.	0 µl
*****	0 µl
Reagent 1	30 sec
Reag. Vol.	Inhib 125 µl
Rinse	125 µl
Reagent 2	120 sec
Chromo	Chromo 20 µl
Rinse	100 µl
Reagent 3	210 sec
Reag. Vol.	Ecarin 20 µl
Rinse	50 µl

(Rinse: 1%ige Natrium-Hypochloritlösung)

20 In der Fig. 1 ist die erhaltene Standardkurve wieder-
 gegeben. Es fällt der extrem gute Korrelationskoef-
 fizient von 0,9977 auf. Im Experiment wird lediglich
 die Standardprobe durch eine zu bestimmende Probe er-
 setzt und die unbekannte Hirudinkonzentration in der
 25 Figur 1 anhand der gemessenen Abnahme der optischen
 Dichte abgelesen.

30

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von
Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben Körper-
flüssigkeit oder einem nicht-trüben Extrakt aus
einer Körperflüssigkeit mit den folgenden
Verfahrensschritten:
 - a) einem Lebewesen wird die Körperflüssigkeit ent-
nommen und die Körperflüssigkeit wird erforder-
lichenfalls einer Abtrennung von Trübstoffen
unterworfen,
 - b) der in Stufe a) erhaltene nicht-trübe Körper-
flüssigkeit werden ein nicht in die Umwandlung
Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mdesfgl
eingreifendes gerinnungshemmendes Mittel, ein
durch aktives Meizothrombin bzw. Mdesfgl
spaltbares chromogenes oder flourogenes Sub-
strat und eine Prothrombin in Meizothrombin
bzw. Mdesfgl spaltende Substanz oder Mei-
zothrombin bzw. Mdesfgl zugegeben, sowie, op-
tional, Prothrombin,
 - c) die in Stufe b) erhaltene Lösung bzw. Mischung
wird einer wellenlängenselektiven Lichtabsorp-
tions- oder Lichtemissionsmessung in Abhängig-
keit von der Zeit unterworfen,
 - d) aus der Verminderung der Lichtabsorption oder
Lichtemission in Stufe c) je Zeiteinheit wird
die in der Körperflüssigkeit enthaltene Menge

Vergleich mit ermittelten Standardkurven
bestimmt.

- 5 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das nicht
in die Umwandlung Prothrombin/aktives Meizothrombin
bzw. Mdesfgl eingreifende gerinnungshemmende Mit-
tel ausgewählt ist aus der Gruppe "Calcium-
Komplexbildner, Heparin, Heparinoide, Antithrombin
10 III, Protein C, Fibrinpolymerisationshemmstoffe und
Mischungen aus diesen Stoffen".
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei
15 die Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mdesfgl
spaltende Substanz ausgewählt ist aus der Gruppe
der Schlangengifte und Schlangengiftfraktionen.
- 20 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei
die Prothrombin in Meizothrombin Bzw. Mdesfgl
spaltende Substanz Ecarin ist.
- 25 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei
das durch aktives Meizothrombin bzw. Mdesfgl
spaltbare chromogene Substrat unter Spaltung p-
Nitroanilin freisetzt und die Lichtabsorptionsmes-
30 sung bei 405 nm durchgeführt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei
in Stufe c) eine erste Absorptions- oder

- Emissionsmessung nach 0 - 100 s, vorzugsweise 0 - 50, höchstvorzugsweise 5 - 15 s, und eine zweite nach anschließenden 10 - 1000 s, vorzugsweise 50 - 500 s, höchstvorzugsweise 150 - 300 s, gezählt ab
- 5 Zugabe der Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltenden Substanz oder des Meizothrombins bzw. Mtdesfgl, durchgeführt werden.
- 10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Thrombininhibitor Hirudin, ein Hirolog oder ein synthetischer Thrombininhibitor ist.
- 15 9. Test Kit zur Bestimmung der Konzentration von Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben Körperflüssigkeit oder einem nicht-trüben Extrakt aus einer Körperflüssigkeit mit folgenden Kitkomponenten: K1) einer Lösung eines nicht in die Umwandlung
- 20 Prothrombin/aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl eingreifenden gerinnungshemmenden Mittel; K2) einem durch aktives Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbaren chromogenen oder flourogenen Substrat und K3) einer Lösung einer Prothrombin in Meizothrombin
- 25 bzw. Mtdesfgl spaltenden Substanz, wobei die Komponente K3) ersetzt oder ergänzt sein kann durch eine Komponente K3a) einer Lösung mit Meizothrombin bzw. Mtdesfgl.
- 30 10. Test Kit zur Bestimmung der Aktivität von Thrombininhibitoren in einer nicht-trüben Körperflüssigkeit oder einem nicht-trüben Extrakt aus einer Körperflüssigkeit oder einer nicht-trüben nicht

natürlichen wäßrigen Flüssigkeit mit folgenden
Kitkomponenten: optional K1) einer Lösung eines
nicht in die Umwandlung Prothrombin/aktives Mei-
zothrombin bzw. Mtdesfgl eingreifenden gerinnung-
5 shemmenden Mittel, K2) einem durch aktives
Meizothrombin bzw. Mtdesfgl spaltbaren chromogenen
oder flourogenen Substrat und K3) einer Lösung
einer Prothrombin in Meizothrombin bzw. Mtdesfgl
spaltenden Substanz, wobei die Komponente K3) er-
10 setzt oder ergänzt sein kann durch eine Komponente
K3a) einer Lösung mit Meizothrombin bzw. Mtdesfgl.

11. Test Kit nach Anspruch 9 oder 10, wobei die
15 Kitkomponenten voneinander getrennt aber in einer
einzigen Testkitpackung vorgesehen sind.

12. Test Kit nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei
20 als optional einsetzbare zusätzliche Kitkomponente
eine Lösung mit Prothrombin vorgesehen ist.

13. Thrombininhibitoren, welche erhältlich sind durch
25 folgende Verfahrensschritte:

A) Elemente einer Gruppe von prospektiven Throm-
bininhibotoren werden in vorgebener und vor-
zugsweise gleicher Konzentration subsequent
30 oder getrennt simultan einem Verfahren nach
einem der Ansprüche 2 bis 8 unterworfen,

19

5 B) Die Verminderung der Lichtabsorption oder Lichtemission je Zeiteinheit wird für jeden prospektiven Thrombininhibitor ermittelt und mit der unter gleichen Bedingungen bestimmten Lichtabsorption oder Lichtemission je Zeiteinheit einer vorzugsweise gleichen Konzentration von Hirudin verglichen,

10 C) es werden diejenigen prospektiven Thrombininhibitoren ausgewählt, deren Abnahme der Lichtabsorption oder Emission je Zeiteinheit mindestens 10% der entsprechenden Abnahme bei Einsatz von Hirudin entspricht.

15

20

25

30

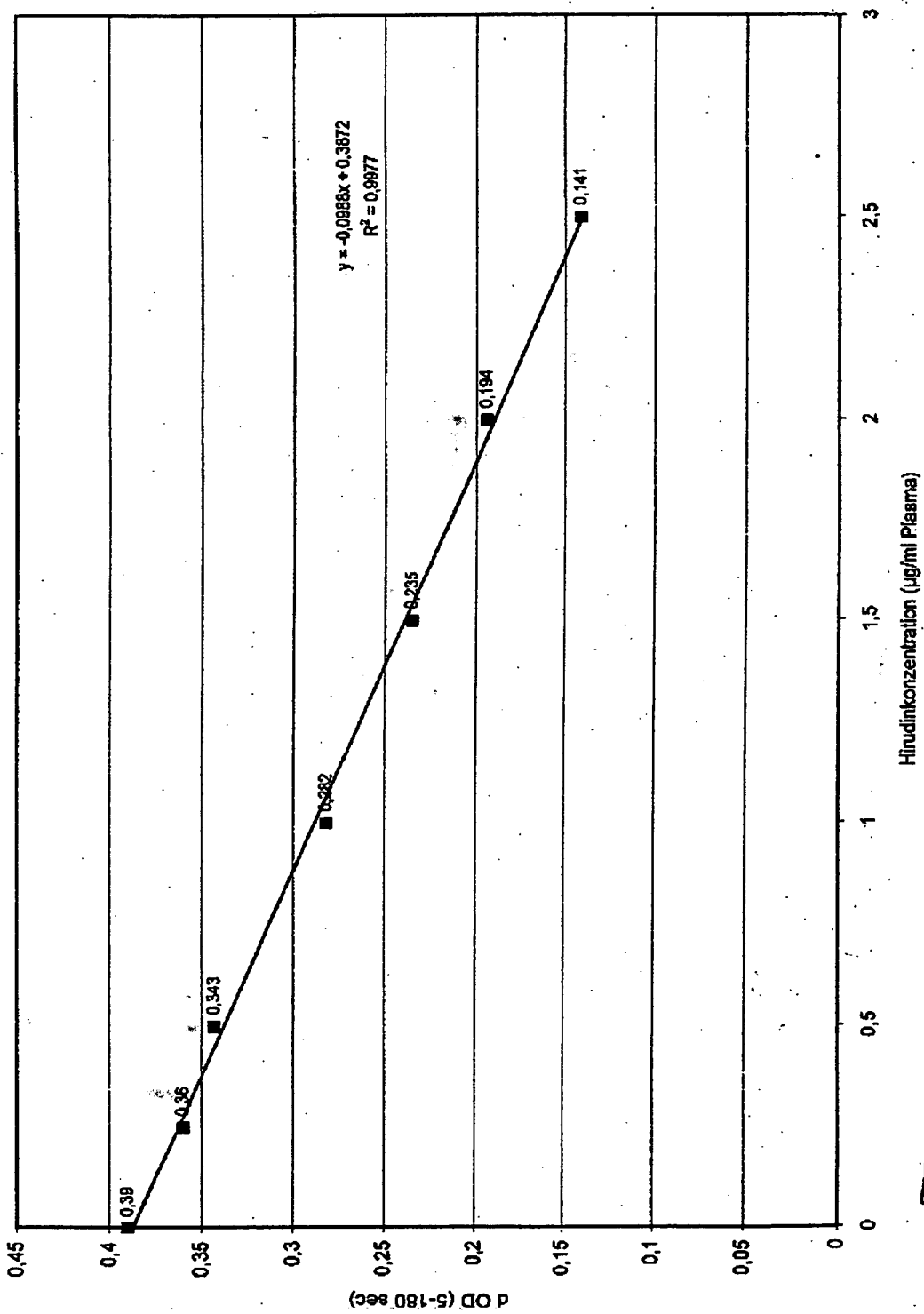


Fig. 1